

L'identification moléculaire de micros algues vertes indigènes.

Bélanger, Isabelle

Université Laurentienne, iy_belanger@laurentian.ca,

Dr. Gregory Ross,

NOSM, gross@nosm.ca

Dr. Thomas Merritt,

Université Laurentienne, tmerritt@laurentian.ca

Introduction

Les algues sont une source viable et renouvelable de plusieurs produits essentiels. L'industrie de suppléments nutritionnels, l'industrie de prospection de sources de biocarburant et l'industrie pharmaceutique prennent un intérêt particulier à la caractérisation d'algues indigènes (Borowitzka). L'École de Médecine du Nord de l'Ontario (NOSM) est en pleine étude de plusieurs souches de micro-algues vertes qui se retrouvent au sein d'environnements pollués en proximité des sites miniers abandonnés. Les conditions sulfuriques et en ions métalliques élevés créent un environnement unique où prospèrent des micro-algues vertes qui ont le potentiel de produire des composés d'intérêt (Eibl, et al., 2014).

Afin de publier les résultats obtenus, il est important de pouvoir identifier les organismes à l'étude. Il y a deux techniques reconnues pour identifier les micro-algues : l'identification morphologique et l'identification moléculaire. L'identification morphologique est un processus difficile et peu fiable puisque les micro-algues ont tendance à changer de forme en fonction de leur environnement et en fonction de leur stade de développement. Ceci ne veut pas dire qu'une identification morphologique est inutile, il est simplement avantageux de confirmer cette identification putative en faisant une identification moléculaire (Manoylov, 2014). Quand on parle d'identification moléculaire, il s'agit habituellement d'identifier un organisme basé sur sa séquence nucléotidique dans un gène particulier. Le gène en question doit être assez mutable pour être significativement différent entre les espèces, mais aussi assez bien conservé pour permettre d'associer les individus à leur espèce.

Méthodologie

Dans cette étude, le gène analysé est l'Espaceur Interne Transcrit 2 de l'ADN ribosomique. Cette séquence est non-codante et donc plus susceptible aux mutations silencieuses. Ce gène est présent chez tous les organismes et il est bien caractérisé chez les algues. De plus, il existe plusieurs amorces universelles pour l'amplification de cette séquence (Buchheim, et al., 2011).

Une difficulté sous-estimée de ce projet est de développer un protocole qui est applicable et efficace pour l'identification d'une grande variété de micro-algues. Certaines méthodes ne fonctionnent que sur un faible pourcentage des organismes à l'étude. Par exemple, la lyse chimique en utilisant des protéases est seulement efficace contre les algues qui n'ont pas de mucilage. Pour cette raison, la méthode de lyse utilisée est une combinaison de lyse mécanique par impact et de lyse chimique par perforation au chloroforme et par dénaturation par détergent (Fawley & Fawley, 2004). La solution tampon utilisée est forte en EDTA (30mM) et en sodium (1M NaCl).

Bien que cette méthode soit efficace pour la lyse des nombreuses souches d'algues identifiées, l'EDTA de la solution tampon agit comme agent chélateur et forme un complexe avec le magnésium, ce qui inhibe efficacement l'activité enzymatique. Ceci est désirable lors de la lyse afin de protéger les acides nucléiques des ADNases en solution, mais cette même propriété inhibe la polymérase utilisée lors de l'amplification du gène. Il est donc important de

faire une précipitation de l'ADN en solution par éthanol, et de re-suspendre ce dernier dans une nouvelle solution tampon sans EDTA.

L'amplification a été optimisée en ajoutant du magnésium et en augmentant le volume d'ADN ajouté. Les produits obtenus ont été visualisés dans un gel à deux pourcent d'agarose afin de confirmer que la longueur des amplicons soit conforme aux attentes (entre 400 et 500 paires de bases). Les amplicons ont ensuite été soumis à Génome Québec afin d'être séquencés. La méthode de séquençage utilisé est la méthode Sanger.

Les séquences reçues ont été comparées aux séquences de la base de données GenBank du NCBI (National Center for Biotechnology Information) par l'entremise de l'engin d'alignement BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Jusqu'à cinq séquences contrôle ont été ajoutées à l'alignement de séquences dans le programme MEGA 6. Cet alignement a été analysé afin de produire des arbres de phylogénie.

La méthode d'inférence Bayésienne a été utilisée afin d'estimer le degré d'appartenance des séquences sur un million de générations. Les résultats obtenus ont été comparés au consensus obtenu à partir d'une analyse de maximum de vraisemblance auto-amorcée mille fois.

Résultats/Conclusion

Les résultats démontrent que les échantillons 415, 416, 636 et 624 sont des souches de *Chlamydomonas debaryana*, que l'échantillon 603 est vraisemblablement une espèce de *Pseudococcomyxa* et que l'échantillon 604 est probablement une espèce de *Coccomyxa*. De plus l'échantillon 410 est une souche de *Desmodesmus* et que l'échantillon 238 est une souche de *Chlorococcum tatrense*. Cette identification permettra potentiellement d'établir une corrélation entre les gènes et leur potentiel industriel et permettra d'optimiser les conditions de croissance afin de maximiser la reproduction des micro-algues.

Bibliographie

- Borowitzka, M. A. (n.d.). Pharmaceuticals From Algae. In *Biotechnology* (Vol. 7). Encyclopedia Of Life Support Systems.
- Buchheim, M. A., Keller, A., Koetschan, C., Förster, F., Merget, B., & Wolf, M. (2011). Internal Transcribed Spacer 2 (nu ITS2 rRNA) Sequence-Structure Phylogenetics: Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life. *PLOS one*, 6(2). doi:10.1371/journal.pone.0016931
- Eibl, J. K., Corcoran, J. D., Senhorinho, G. N., Zhang, K., Hosseini, N. S., Marsden, J., . . . Ross, G. M. (2014). Bioprospecting for acidophilic lipid-rich green microalgae isolated from abandoned mine site water bodies. *AMB Express*, 4(7). doi:10.1186/2191-0855-4-7
- Fawley, M. W., & Fawley, K. P. (2004). A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *Journal of Phycology*, 40(1), 223-225.
- Manoylov, K. M. (2014). Taxonomic identification of algae (morphological and molecular): species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment. *Journal of Phycology*, 50(3), 409-424. doi:10.1111/jpy.12183